临床研究

CCND1基因G870A多态性与消化系统肿瘤的相关性

杨淑敏[1]，师雅琳[2]
[1]焦作职工医学院，河南 焦作 454000；[2]郑州市妇幼保健院，河南 郑州 450012

摘要：目的 探讨CCND1基因G870A多态性与消化系统肿瘤的相关性。**方法** 选取我院2010年8月~2014年8月的164例消化系统肿瘤患者作为病例组（分为胃癌组、结直肠癌组各82例），选取同期健康体检的82例健康人群作为对照组，并采用聚合酶链反应—限制性片段长度多态性（PCR-RFLP）方法对3组研究对象的CCND1基因G870A基因分布频率分析，并与消化系统肿瘤发病的分期、分级的关系进行分析。**结果** 胃癌组、结直肠癌组的CCND1基因G870A位点中的GG、GA和AA的分布频率与对照组存在明显差异（P<0.05）；CCND1基因G870A位点多态性与消化系统肿瘤发病的危险升高具有良好的相关性（P<0.05）；GA和AA基因型发生消化系统肿瘤发病危险明显高于GG基因型，具有统计学意义（P<0.05）；而且高分化和高分期患者的基因型分布率高于低分化和低分期的患者，具有统计学意义（P<0.05）。**结论** CCND1基因G870A多态性与消化系统肿瘤发病危险有关，而且含有A基因型更容易发生消化系统肿瘤，与消化系统肿瘤分化和分期相关。
关键词：CCND1基因；G870A位点；多态性；消化系统肿瘤；分期

Correlation analysis of G870A CCND1 gene polymorphism with digestive system tumors

YANG Shumin[1], SHI Yalin[2]
[1]Jiaozuo Worker Medical School, Jiaozuo 454000, China; [2]Zhengzhou Maternity and Child Healthcare Hospital, Zhengzhou 450012, China

Abstract: Objective To study the correlation of G870A CCND1 gene polymorphism and digestive system tumors. **Methods** From August 2010 to August 2014, 164 digestive system cancer patients (including 82 patients with gastric cancer and 82 with colorectal cancer) and 82 healthy subjects (control group) were examined with PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The distribution of CCND1 gene G870A frequency in the 3 groups and its association with tumor staging and grading were analyzed. **Results** The frequencies of the GG, GA and AA genotypes in G870A CCND1 gene loci in patients with gastric cancer and colorectal cancer differed significantly from those in the control group (P<0.05). G870A CCND1 gene polymorphism was closely associated with an increased risk of digestive system tumors (P<0.05). The GA and AA genotypes were associated with a significantly higher risk of digestive system cancer risk than the GG genotype (P<0.05), and their frequencies were significantly higher in patients with tumors of higher pathological grade and in those in advanced tumor stages (P<0.05). **Conclusion** G870A CCND1 gene polymorphism is associated with the risk of digestive system tumors. The allele A is associated with an increased risk of digestive system tumors and correlated with the tumor differentiation and staging of the tumor.
Key words: CCND1 gene; G870A sites; polymorphism; digestive system tumors; tumor staging

消化系统肿瘤包括上消化道肿瘤和下消化道肿瘤，如食管癌、胃癌、大肠癌（直肠癌、结肠癌）及原发性肝癌等[1]，此发病与多种因素有关。当前研究比较多的是CCND1基因，CCND1基因位于11q13染色体，包括5个外显4个内含子，长约15 kb，编码细胞周期蛋白D1[2]。在CCND1基因的第4号外显子最后一个碱基上存在6870A多态性，这个位点的基因型的变化与多种肿瘤疾病有关，如肝癌、乳腺癌、肺癌、口腔癌、宫颈癌等与CCND1基因G870A多态性的研究也比较多，但是关于CCND1基因G870A多态性与消化系统肿瘤的研究比较少，有研究认为CCND1基因G870A多态性与消化系统肿瘤发生有关，但是不同的消化道肿瘤的结果存在一定的差异。本研究针对这些特点，将消化系统肿瘤中的食管癌、胃癌、直肠癌、结肠癌的发病与CCND1基因G870A多态性的相关性进行研究，确定每种消化道肿瘤的发病与CCND1基因G870A多态性的关系。

收稿日期：2016-06-19
作者简介：杨淑敏，讲师，E-mail: 443040862@qq.com

1 资料和方法

1.1 一般资料

我院于2010年8月~2014年8月的164例消化系统肿瘤患者作为病例组（分为胃癌组、结直肠癌组各82例），选取同期健康体检的82例健康人群作为对照组。所有患者均经过病理切片证实为胃癌、结直肠癌，并签知情同意书。排除严重的脑、肝、肾功能损害及血液系统等疾病。3组研究对象在性别、年龄等方面没有明显差异（P>0.05，表1），具有可比性。

表1 3组研究对象的基本资料比较

Tab.1 Comparison of demographic data among the 3 groups (n=82)

Project		Gastric cancer group	Colorectal cancer group	Control group	P
Gender	Male	59（72.0）	58（70.7）	60（73.2）	>0.05
	Female	23（28.0）	24（29.3）	22（26.8）	>0.05
Age (years old)		57.9±15.2	58.2±14.2	57.2±15.2	>0.05

1.2 方法

1.2.1 外周血基因组DNA提取 主要试剂：TaqDNA聚合酶试剂、dNTPs、蛋白酶K、电泳琼脂糖、DNA marker、饱和酚。

主要仪器设备：PCR扩增仪、紫外分光光度计、电泳仪、凝胶成像分析系统。采集对照组及病例组患者的EDTA-Na2抗凝血2 mL，用常规酚氯仿法提取外周血基因组DNA并测定DNA的浓度和纯度，低温保存。

1.2.2 CCND1基因G870A多态基因型的测定 CCND1基因G870A多态基因型的引物，上游引物-5，5'-AGTTCATTTCCAATCCGCCC-3'，下游引物-3，5'-TTCCGTGGCACTAGGTGTC-3'。PCR反应体系[5]：加入10倍Buffer 2.0 μL $MgCl_2$ 及2.0 μL dNTP，0.4 μL上下游引物，0.4 μL TaqDNA聚合酶，0. 25 μL DNA模板以及2 μL双蒸水补足至总溶液体积为20 μL。PCR反应条件[6]：95 ℃预变性5 min，95 ℃变性反应45 s，52 ℃条件下退火45 s，72 ℃延伸反应1.5 min，重复35个循环，72 ℃延伸反应15 min，然后进行PCR扩增，扩增后采用1.5%琼脂糖电泳检测扩增产物。PCR产物用限制性内切酶DNA marker 在37 ℃水浴条件消化反应16 h后，酶切产物经1.5%琼脂糖凝胶进行电泳检测，即得到DBCCR1多态基因型的基因分型。

1.3 统计学方法

数据分析使用SPSS19.0 统计学软件，数据符合正态分布，用基因计数法计算病例组和对照组的基因型和等位基因的分布频率，等位基因频率=(2×纯合子数+杂合子数)/(2×受检人群)。计数数据用例数和%表示，计数数据进行χ^2检验，P<0.05 表示差异，有统计学意义。

2 结果

2.1 3组研究对象的CCND1基因G870A基因型分布频率的比较

胃癌组、结直肠癌组的CCND1基因G870A位点中的GG、GA和AA的分布频率与对照组存在明显差异（P<0.05，表2）。

表2 3组研究对象的CCND1基因G870A基因型分布频率的比较

Tab.2 Comparison of the frequency of G870A genotype of the CCND1 gene in the 3 groups (n, %)

Group		GG	GA	AA	GA+AA
Case group (n=164)	Gastric cancer group (n=82)	16（19.5）	46（56.1）	20（24.4）	66（80.5）
	Colorectal cancer group (n=82)	14（17.1）	50（61.0）	18（22.0）	68（82.9）
Control group (n=82)	-	40（48.8）	30（36.6）	12（14.6）	42（51.2）
χ^2 value	-	4.248	5.246	4.098	5.956
P	-	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

2.2 消化系统肿瘤的分级和分期与CCND1基因G870A基因型分布比较

由表3，4可知GA和AA基因型发生消化系统肿瘤发病危险明显高于GG基因型，具有统计学意义（P<0.05）；而且高分化和高分期患者的基因型分布率高于低分化和低分期的患者，具有统计学意义（P<0.05）。

2.3 CCND1基因G870A多态性与消化系统肿瘤发病危险的相关性分析

由表5可知CCND1基因G870A位点多态性与消化系统肿瘤发病的危险升高具有良好的相关性（P<0.05）。

表3 胃癌的分级和分期与CCND1基因G870A基因型分布比较

Tab.3 Comparison of the classification and staging of gastric cancer with G870A gene CCND1 genotype distribution (*n*, %)

Gastric cancer grading		GG	GA	AA	GA+AA
Degree of differentiation	Advanced differentiation (*n*=30)	4 (13.3)	19 (63.3)	7 (23.3)	26 (86.7)
	Lower differentiation (*n*=52)	18 (23.4)	19 (37.5)	15 (39.1)	34 (65.4)
χ^2	-	4.249	5.279	4.987	6.047
P	-	0.035	0.029	0.036	0.021
TNM staging	I-II (*n*=52)	21 (40.4)	15 (28.8)	16 (30.8)	31 (59.6)
	III-IV (*n*=30)	6 (20.0)	20 (66.7)	4 (13.3)	24 (80.0)
χ^2	-	5.054	5.876	5.665	6.495
P	-	0.026	0.019	0.022	0.018

表4 结直肠癌的分级和分期与CCND1基因G870A基因型分布比较

Tab.4 Classification and staging of colorectal cancer and the distribution of G870A gene CCND1 genotype (*n*, %)

Grading of colorectal cancer		GG	GA	AA	GA+AA
Degree of differentiation	Advanced differentiation (*n*=31)	5 (16.1)	15 (48.4)	11 (35.5)	26 (83.9)
	Lower differentiation(*n*=51)	13 (25.5)	15 (29.4)	23 (45.1)	38 (74.5)
χ^2	-	4.249	5.279	4.087	5.947
P	-	0.025	0.039	0.046	0.021
TNM staging	I-II (*n*=51)	25 (49.0)	15 (29.4)	11 (21.6)	26 (51.0)
	III-IV (*n*=31)	6 (19.3)	21 (67.7)	4 (12.9)	25 (80.6)
χ^2	-	5.889	5.576	4.365	6.295
P	-	0.025	0.029	0.036	0.015

表5 CCND1基因G870A多态性与胃癌发病危险的相关性分析

Tab.5 Correlation Analysis between CCND1 gene G870A polymorphism and risk of gastric cancer

Gastric cancer grading		GG	GA	AA	*P*	GA+AA	*P*
Degree of differentiation	Advanced differentiation (*n*=30)	4 (13.3)	19 (63.3)	7 (23.3)	0.025	26 (86.7)	0.021
	Lower differentiation (*n*=52)	18 (23.4)	19 (37.5)	15 (39.1)		34 (65.4)	
TNM staging	I-II (*n*=52)	21 (40.4)	15 (28.8)	16 (30.8)	0.031	31 (59.6)	0.018
	III-IV (*n*=30)	6 (20.0)	20 (66.7)	4 (13.3)		24 (80.0)	

3 讨论

肿瘤被认为是一类细胞周期性疾病，其细胞生长周期的失调是肿瘤的发生发展过程中起关键作用[7]。细胞周期蛋白D1在正常细胞周期的调控中起到重要作用，编码细胞周期蛋白D1的基因即CCND1基因的G870A基因与多种肿瘤的发生具有一定的相关性[8]。CCND1基因的G870A多态性与宫颈癌、口腔癌等疾病的相关性的研究比较，研究发现其发病与CCND1基因

的G870A多态性的基因分布有密切关系。有研究[9]发现CCND1基因的G870A多态性与消化系统肿瘤有关，而且上消化道肿瘤和下消化道肿瘤与CCND1基因的G870A多态性的关系存在一定的差异。

下消化道系统肿瘤主要是结肠癌和直肠癌，而且容易2种肿瘤同时发生，出现结肠癌，对CCND1基因的G870A多态性与结肠癌的发病的相关性的研究也比较多。有研究[10-12]报道直肠癌的发病风险增加与CCND1基因的G870A多态性，而且男性患者的A等位基因增加结直肠癌发病风险的作用，含A等位基因的患者发生结肠癌的几率就会增加。也有研究[13]报道结直肠癌家族史的AA和AG基因型人群发生结直肠癌的危险性增加，而GG提高转移的发生。而其他的研究显示无此研究结果。本研究的结果和此研究的结果基本一致，但是没有对性别进行分析，只是对CCND1基因的G870A多态性与结肠癌患者的发病的危险性进行分析，分析也发现含有A等位基因的患者发生结肠癌的几率就会增加。

上消化道肿瘤主要是食管癌和胃癌等，对CCND1基因的G870A多态性与上消化道肿瘤的研究显示上消化道肿瘤的发病与CCND1基因的G870A多态性有密切关系。有研究[14]报道胃癌癌前病变的研究显示AA基因型能够明显提高肠上皮化生的危险，含A等位基因的患者发生肿瘤的危险性比较大。本研究通过研究也显示CCND1基因的G870A的A等位基因或AA基因型发生胃癌的几率明显高于GG基因型，而且更容易患病。

本研究针对当前研究的特点将消化系统肿瘤中比较常见的肿瘤胃癌和结肠癌与CCND1基因G870A多态性的相关性进行分析，从而确定CCND1基因G870A多态性与消化系统肿瘤发病危险性的关系。通过研究发现胃癌和结肠癌的CCND1基因G870A的AA、AG、GG基因型的分布频率与健康人群存在明显差异，而且对肿瘤的分化程度及分期的CCND1基因G870A的AA、AG、GG基因型的分布频率的关系，结果发现分化程度越严重及分期越高，AA+AG的分布频率就会越高，而且对CCND1基因G870A多态性与消化系统肿瘤的相关性分析显示含有A基因型更容易发生发病。

综上所述，CCND1基因G870A多态性与消化系统肿瘤发病危险有关，而且含有A基因型更容易发生消化系统肿瘤，与消化系统肿瘤分化和分期相关。

参考文献：

[1] Xu X, Yang X, Ru G, et al. miR-146a gene polymorphism rs2910164 and the risk of digestive tumors: a meta-analysis of 21 case-control studies[J]. Oncol Rep, 2014, 31(1): 472-9.

[2] Wang S, Wang Z. Prognostic value of long noncoding RNA HOTAIR in digestive system malignancies[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2015, 30(7): 1123-33.

[3] Chen B, Cao L, Yang P, et al. Cyclin D1 (CCND1) G870A gene polymorphism is an ethnicity-dependent risk factor for digestive tract cancers: a meta-analysis comprising 20, 271 subjects[J]. Cancer Epidemiol, 2012, 36(2): 106-15.

[4] Hu Z, Zhou Z, Xiong G, et al. Cyclin D1 G870A polymorphism and the risk of hepatocellular carcinoma in a Chinese population[J]. Tumour Biol, 2014, 35(6): 5607-12.

[5] Chen X, Zhao T, Li L, et al. CCND1 G870A polymorphism with altered cyclin D1 transcripts expression is associated with the risk of glioma in a Chinese population[J]. DNA Cell Biol, 2012, 31(6): 1107-13.

[6] Cander S, Erturk E, Karkucak M, et al. Effect of cycline D1 (CCND1) gene polymorphism on tumor formation and behavior in patients with prolactinoma[J]. Gene, 2012, 509(1): 158-63.

[7] Yang J, Zhang G, Chen J. CCND1 G870A polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer, especially for sporadic colorectal cancer and in Caucasians: a meta-analysis[J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2012, 36(2): 169-77.

[8] Xue Y, Rong L, Tong N, et al. CCND1 G870A polymorphism is associated with toxicity of methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(9): 11594-600.

[9] Zeng Z, Tu J, Cheng J, et al. Influence of CCND1 G870A polymorphism on the risk of HBV-related HCC and cyclin D1 splicing variant expression in Chinese population[J]. Tumour Biol, 2015, 36(9): 6891-900.

[10] Wang S, Huang Y, Su R, et al. Cyclin D1 G870A polymorphism is associated with an increased risk of multiple myeloma[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(2): 5856-61.

[11] Ma G, Wang Q, Lv C, et al. The prognostic significance of HOTAIR for predicting clinical outcome in patients with digestive system tumors[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2015, 141(12): 2139-45.

[12] Atac A, Riecke B, Assaf AT, et al. Lack of evidence for predictive and prognostic value of cyclin D1 gene polymorphism CCND1 G870A for oral squamous cell carcinoma[J]. Anticancer Res, 2014, 34(1): 235-8.

[13] Delektorskaia VV, Kushliskiĭ NE. Neuroendocrine tumors of digestive system: morphologic spectrum and cell proliferation (Ki67 index)[J]. Vestn Ross Akad Med Nauk, 2013, (5): 28-37.

[14] Roesch-Dietlen F, Jiménez-García VA, Remes-Troche JM, et al. Epidemiologic behavior of malignant digestive tract tumors over a five year period in Veracruz, Mexico[J]. Rev Gastroenterol Mex, 2012, 77(1): 3-8.

（编辑：孙昌朋）